柑橘全爪螨热激蛋白基因 *PcHsp*90 的克隆及表达模式分析

杨丽红[1,2], 豆 威[2], 蒋红波[2], 牛金志[2], 丁天波[2], 王进军[2,*]

(1. 绵阳师范学院生命科学与技术学院, 生态安全与保护四川省重点实验室, 四川绵阳 621006;
2. 西南大学植物保护学院, 昆虫学及害虫控制工程重庆市市级重点实验室, 重庆 400715)

摘要:【目的】研究热激蛋白基因 *Hsp*90 在柑橘全爪螨 *Panonychus citri* 生长发育及响应高温和低温胁迫方面的作用。【方法】采用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆柑橘全爪螨 *Hsp*90 基因 cDNA 全长序列;利用生物信息学软件分析该基因的序列特性;运用荧光 Real-time PCR 技术,分析 *Hsp*90 基因 mRNA 在该螨各发育阶段、高温及低温胁迫条件下的表达模式。【结果】克隆鉴定出柑橘全爪螨一条 *Hsp*90 基因的 cDNA 全长序列,命名为 *PcHsp*90(GenBank 登录号: GQ495086),全长为 2 763 bp,包含 2 193 bp 的开放阅读框,编码 730 个氨基酸,编码蛋白质的理论分子量和等电点分别为 83.85 kDa 和 4.99,氨基酸序列包括 Hsp90 家族的 5 个特征基序及细胞质型 Hsp90 的特征序列 “MEEVD”。系统进化分析表明,PcHsp90 与朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus* 的 Hsp90 首先聚为一支,然后再与肩突硬蜱 *Ixodes scapularis* 的 Hsp90 聚合,说明它们较近的亲缘关系。*PcHsp*90 在柑橘全爪螨的各发育阶段均有所表达,其中在幼螨期表达量较低,且显著低于若螨和成螨期的表达水平(P = 0.015)。0 ~ 10℃ 低温胁迫下,*PcHsp*90 的 mRNA 相对表达量无显著变化(P = 0.492);但在 35 ~ 41℃ 高温胁迫下,*PcHsp*90 的 mRNA 相对表达量随胁迫温度的升高而上调,尤其是当温度升高到 41℃ 时,mRNA 相对表达量达到对照(25℃)的 6.75 倍,且差异达显著水平(P = 0.007)。【结论】柑橘全爪螨 *PcHsp*90 不仅对该螨的生长发育具有重要作用,而且是其响应高温胁迫的重要机制之一。

关键词: 柑橘全爪螨; 热激蛋白 90; cDNA 克隆; 低温胁迫; 高温胁迫; 发育阶段; mRNA 表达
中图分类号: Q966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2016)04-411-10

Cloning and expression profiling of heat shock protein gene *PcHsp*90 in the citrus red mite, *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae)

YANG Li-Hong[1,2], DOU Wei[2], JIANG Hong-Bo[2], NIU Jin-Zhi[2], DING Tian-Bo[2], WANG Jin-Jun[2,*]
(1. Ecological Security and Protection Key Laboratory of Sichuan Province, College of Life Science and Biotechnology, Mianyang Teachers' College, Mianyang, Sichuan 621006, China; 2. Key Laboratory of Entomology and Pest Control Engineering, College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract:【Aim】To explore the roles of *Hsp*90 gene in development and response to heat and cold stress in the citrus red mite, *Panonychus citri*.【Methods】The full-length cDNA encoding Hsp90 from *P. citri* was cloned and identified using RT-PCR and RACE technique. Bioinformatics programs were used to analyze the sequence characteristics of the gene. The mRNA expression levels of the gene in this mite at different developmental stages and under cold and heat stress conditions were detected by real-time PCR.【Results】The complete cDNA of the cloned gene *PcHsp*90 with GenBank accession no. GQ495086 is

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(201103020); 绵阳师范学院项目(2012A15, QD2013A06)
作者简介: 杨丽红, 女, 1974 年 12 月生, 陕西勉县人, 博士, 副教授, 研究方向为昆虫分子生态学, E-mail: yanglihong75@163.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: wangjinjun@swu.edu.cn
收稿日期 Received: 2016-01-12; 接受日期 Accepted: 2016-03-21

2 763 bp in length, and contains an open reading frame of 2 193 bp, which encodes a protein of 730 amino acids, with the molecular weight of 83.85 kDa and the theoretical isoelectric point of 4.99. The deduced amino acid sequence contains five highly conserved motifs of Hsp90 family and the cytoplasmic Hsp90 C-terminal region "MEEVD". Phylogenetic analysis showed that PcHsp90 clustered firstly with Hsp90 of *Tetranychus cinnabarinus*, and then with that of *Ixodes scapularis*, suggesting the close relationship among them. *PcHsp*90 transcripts were all detected at different developmental stages, and the relative mRNA expression level was significantly lower at larval stage than those at nymphal and adult stages ($P = 0.015$). No distinct change was found in relative *PcHsp*90 mRNA expression levels in the mites subjected to 0 –10℃ cold stress ($P = 0.492$), but a significant up-regulation was observed in the mites subjected to 35 –41℃ heat stress ($P = 0.007$); especially when the temperature was up to 41℃, the mRNA level was 6.75-fold as high as that of the control (25℃).【Conclusion】*PcHsp*90 may be involved in development and plays an important role in response to heat stress in *P. citri*.

Key words: *Panonychus citri*; Hsp90; cDNA cloning; cold stress; heat stress; developmental stage; mRNA expression

害螨是变温动物,环境温度对其生长、发育、存活及生殖等生命活动具有重要影响。当外界温度超过其适宜范围时,害螨的生命活动将会受到胁迫。热激蛋白(heat shock proteins, Hsps),又称热休克蛋白,是指生物在受到高温或低温等逆境刺激后大量表达的蛋白质,广泛存在于原核生物和真核生物体内,在生物体正常生命活动和胁迫应激中起重要作用。Hsps 的诱导表达是害螨抵御高低温胁迫的重要机制之一(Feder and Hofmann, 1999; Tkáčová and Angelovičová, 2012)。根据分子量和同源性,Hsps 可分为以下几个家族: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 和小分子 Hsps (Sørensen *et al*., 2003)。Hsp90 的重要功能之一是充当分子伴侣,缓解环境胁迫对生物体的伤害,包括高、低温引起的伤害,提高生物体的耐受力,保护机体免受高温或低温伤害进而导致死亡(Johnson, 2012)。Hsp90 的分子伴侣功能包括:促进蛋白质的易位、折叠、降解不稳定的蛋白质,以及防止复合体的聚集等(Makhnevych and Houry, 2011)。另外,Hsp90 不仅可在胁迫条件下被大量诱导表达,即使在正常生理状态下,含量也较高,且在不同发育阶段含量不同,说明 Hsp90 对生物的生长发育具有重要的调节作用(Jiang *et al*., 2012; 韦姣等, 2014)。Hsp90 主要通过影响激素合成、调控细胞周期等方式参与生物的生长发育及分化等生理活动(Li and Du, 2013)。根据 Hsp90 在亚细胞结构中的定位不同,又可以分几个亚组,其中对细胞质型 Hsp90 的研究较多,脊椎动物和酵母具有细胞质型 Hsp90 的 2 个亚型 α 型和 β 型,而多数昆虫体内仅有细胞质型 Hsp90 的 1 个亚型,少数昆虫具有 2 个亚型(Xu *et al*., 2010; Shen *et al*., 2014)。Hsp90 家族基因相对保守,且研究较为广泛,但与昆虫纲比较,对蛛形纲动物 Hsp90 的研究相对较少(Feng *et al*., 2010; 李锐等, 2015)。

柑橘全爪螨 *Panonychus citri* 是一种在全世界范围内发生和危害的害螨,寄主范围广泛,危害包括柑橘类在内的多种植物。1964 年以前,柑橘全爪螨在我国果园的发生并不严重;近年来由于杀螨剂的频繁使用,加上柑橘全爪螨世代周期短、繁殖力强等生物学特点,目前,该螨已发展成为柑橘园危害最为严重的害螨之一,严重影响果实的品质和产量,对柑橘产业造成了重要影响(丁天波等, 2012)。柑橘全爪螨在橘园的发生一年有 2 个高峰期(初夏与秋季)和 2 个低谷期(酷夏与严冬),适合该螨发育的温度范围为 20 ~ 30℃, 35℃以上不利于其发育, 40℃以上死亡率增高(徐南昌等, 2003; Kasap, 2009; 杨丽红等, 2014)。我国柑橘主产区夏季高温常达 40℃,冬季又逼近 0℃。已有研究表明,*Hsp*70*s* 是该螨应对高温胁迫的重要机制之一(Yang *et al*., 2012),而 *Hsp*90 与该螨响应高温和低温胁迫的关系并不明确。随着全球气候变化,极端天气时有发生,温度将成为生物生存的最重要的胁迫因子之一,深入研究 *Hsps* 与害螨之间的关系,显得尤为重要。本研究在克隆该螨 *Hsp*90 基因的基础上,对该基因在不同发育阶段及高温和低温胁迫下的表达模式进行分析,旨在分析 *Hsp*90 基因与该螨的生长发育及与高温和低温胁迫响应的相关性,为理解该害螨生长发育调控及种群季节动态提供分子基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试柑橘全爪螨采自中国农业科学院柑橘研究所果园，在人工气候室饲养 10 多代后，用于本研究。饲养条件为：温度 25 ± 1℃，相对湿度 75% ~80%，光周期 14L∶10D，寄主植物为盆栽枳壳苗，饲养期间不接触任何化学药剂。

1.2 柑橘全爪螨热激蛋白基因 *Hsp*90 的克隆

1.2.1 总 RNA 提取及第一链 cDNA 的合成：收集雌成螨约 100 头于 DEPC 水处理过的 1.5 mL 离心管中，按照柱式微量总 RNA 抽提试剂盒 *Aqua-SPIN* RNA Isolation Micro Kit（上海华舜）提取总 RNA，按照第一链合成试剂盒 PrimeScript® 1st Strand cDNA Synthesis Kit（TaKaRa）的操作说明，反转录合成第一链 cDNA。

1.2.2 热激蛋白基因 *Hsp*90 cDNA 中间片段的克隆：由于热激蛋白高度保守，参考朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus* 的简并引物信息（Feng *et al*., 2010），在上海英骏公司（Invitrogen Life Technologies）合成一对简并引物（本研究所用的所有引物均在该公司合成），命名为 Hsp90F 和 Hsp90R（表 1）。PCR 反应产物经琼脂糖凝胶电泳检测，并用柱式小量凝胶回收试剂盒 Gel Extraction Mini Kit（上海华舜）对目的产物回收。胶回收产物连接至 pGEM®-T Easy 载体（Promega），并转化入感受态细胞 JM109（TaKaRa）中，对含有转化子的大肠杆菌细胞液进行 PCR 扩增鉴定，并将阳性克隆送到上海英骏公司测序。

1.2.3 热激蛋白基因 *Hsp*90 cDNA 末端快速扩增（3′RACE 和 5′RACE）：按照 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit（Clontech, CA, USA）的说明书操作，分别合成 3′端和 5′端第一链 cDNA。根据 1.2.2 节所获得热激蛋白基因 *Hsp*90 cDNA 中间片段的核酸序列，利用 Primer Premier 5.0 软件设计 *Hsp*90 基因 3′-RACE 和 5′-RACE 特异引物 Hsp90S1 和 Hsp90S2 以及 Hsp90A1 和 Hsp90A2（表 1），利用半巢式扩增 3′端和 5′端序列。

1.2.4 热激蛋白基因 *Hsp*90 cDNA 序列全长验证：根据扩增得到的重叠区域序列，利用 DNAMAN 软件（DNAMAN 5.2.2, Lynnon BioSoft）推测出 *Hsp*90 基因 cDNA 全长序列。为验证 *Hsp*90 基因的 cDNA 全长序列，利用 Primer Premier 5.0 设计全长引物 Hsp90FullS 和 Hsp90FullA（表 1）扩增 *Hsp*90 基因 cDNA 的开放阅读框（open reading frame, ORF）。

表 1 本研究使用的引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列（5′–3′） Primer sequence	引物用途 Use of primers
Hsp90F Hsp90R	GTNTTYATHATGGAYAAYTG GNGCYTTCATDATNCKYTCC	中间片段扩增 Intermediate fragment amplification
Hsp90S1	CCACGAAGACACTGGAAACCGAA	3′RACE PCR（第 1 轮）3′RACE PCR（1st round）
Hsp90S2	AGTAGCCGCCTCTGCTTTCGTTG	3′RACE PCR（第 2 轮）3′RACE PCR(2nd round)
Hsp90A1	CAACGAAAGCAGAGGCGGCTACT	5′RACE PCR（第 1 轮）5′RACE PCR（1st round）
Hsp90A2	TTCGGTTTCCAGTGTCTTCGTGG	5′RACE PCR（第 2 轮）5′RACE PCR(2nd round)
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	接头引物 Adaptor primer
Hsp90FullS Hsp90FullA	GAATTTAAAATGCCTGAAGAACC GATTTAATCAACTTCCTCCATTC	cDNA 全长验证 Verification of full-length cDNA
qHsp90S qHsp90A	CCACGAAGACACTGGAAACC AACGAAAGCAGAGGCGG	Real-time PCR 中 *Hsp*90 的扩增 Amplification of *Hsp*90 gene in real-time PCR
qRpIIS qRpIIA	TAGGGGACACTTTCGCTGAT CTCCAGTTTTGTCACGAGCA	Real-time PCR 中内参基因 *RpII* 的扩增 Amplification of reference gene *RpII* in real-time PCR
qα-TubulinS qα-TubulinA	CGAATCCATTTCCCCTTAGT CAACGTCTCCTCGGTAAAGA	Real-time PCR 中内参基因 *α-Tubulin* 的扩增 Amplification of reference gene *α-Tubulin* in real-time PCR

1.3 热激蛋白基因 *Hsp*90 序列生物信息学分析

柑橘全爪螨热激蛋白基因 *PcHsp*90 核苷酸序列的编辑以及氨基酸序列的推导，由在线软件 http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html 完成；运用 NCBI 站点的 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html 查找开放阅读框（ORF）；通过 NCBI 站点的 BLAST 进行同源序列查找；利用软件 Mega 4.0 采用邻接法（Neighbor-Joining method, NJ

method）构建 Hsp90 系统发育树；利用软件 Protparam（http://www.expasy.org/tools/protparam.html）推导 *PcHsp*90 编码蛋白质的氨基酸序列、相对分子量及其等电点等理化性质；根据软件 Scanprosite（http://www.expasy.org/tools/scanprosite/）搜寻 *PcHsp*90 基因编码蛋白的特征基序（Motif）。

1.4 柑橘全爪螨不同发育阶段及热胁迫下 *PcHsp*90 表达模式分析

1.4.1 不同发育阶段螨源收集：将柑橘全爪螨雌成螨挑取到柑橘叶片上，产卵 12 h 后移走雌成螨，待卵发育至 3 日龄，用毛笔挑取约 1 000 粒卵，作为一个处理；让剩余卵继续发育至各发育阶段，期间注意更换柑橘叶片，分别收集活动期的幼螨约 1 000 头、若螨约 600 头、雄成螨约 600 头和雌成螨约 100 头，分别作为一个处理；每个发育阶段设 3 次重复，用于不同发育阶段定量分析用的总 RNA 提取。饲养条件同 1.1 节。

1.4.2 雌成螨高低温胁迫处理：分别挑取雌成螨 100 头于 2 mL 离心管内，置于 0，5，10，25，35，38 和 41℃下处理 1 h，以 25℃为对照，处理所用恒温培养箱为 MIR-154（三洋电子有限公司，日本），用于热胁迫条件下定量分析用的总 RNA 提取，每个处理设 3 次重复。

1.4.3 qPCR 分析用总 RNA 的提取及第一链 cDNA 合成：对 1.4.1 节和 1.4.2 节所收集的材料，按照 RNeasy Plus Micro Kit 试剂盒（Qiagen 公司）说明书，进行总 RNA 提取。反转录按照 PrimeScript® 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒（TaKaRa）说明书操作，合成第一链 cDNA，用于实时荧光定量 PCR（RT-PCR）分析用。

1.4.4 定量引物设计与评价：参考已有研究（Niu *et al*., 2012；Yang *et al*., 2012），基因 *RpII*（RNA polymerase II largest subunit gene）（GenBank 登录号：HM582446）作为不同发育阶段和高温胁迫下的内参基因，基因 *a-Tubulin*（tubulin alpha chain gene）（GenBank 登录号：GU981738）作为低温胁迫下的内参基因，按照 SYBR® Premix Ex Taq™ II（Perfect Real Time）（TaKaRa 公司）说明书操作。每对 qPCR 引物的扩增效率和决定系数（R^2）在定量分析仪上分析完成（Mx3000P，Stratagene），并用蒸馏水做阴性对照，符合要求的定量引物见表 1。

1.4.5 *Hsp*90 mRNA 相对表达量分析：利用定量 PCR 仪 Mx3000P，采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$法，分别就不同发育阶段及高低温胁迫条件下 *PcHsp*90 基因的转录表达量进行定量分析。以雌成螨 *Hsp*90 mRNA 转录表达量作为不同发育阶段的对照；25℃ 处理作为高低温胁迫的对照。

1.5 数据分析

柑橘全爪螨不同发育阶段间及高低温处理间 mRNA 表达差异采用单因素方差分析（ANOVA），平均数的多重比较采用邓肯式新复极差法（Duncan's multiple range test，DMRT），显著性水平为 $P < 0.05$，数据处理软件为 SPSS16.0。

2 结果

2.1 柑橘全爪螨热激蛋白基因 *Hsp*90 cDNA 全长扩增

以柑橘全爪螨的 cDNA 为模板，利用简并引物 Hsp90F 和 Hsp90R 进行 PCR 扩增，获得产物的测序结果表明，产物大小为 748 bp（图 1：A），将该产物的核苷酸片段翻译成氨基酸序列，然后在 NCBI 站点 BLAST 比对，结果表明该片段翻译的氨基酸序列与其他物种 Hsp90 家族高度同源，而且具有 Hsp90 家族的保守序列，说明所得 PCR 产物为柑橘全爪螨 *Hsp*90 家族基因 cDNA 部分序列，命名为 *PcHsp*90。利用 3′-RACE 和 5′-RACE 的特异性引物（表 1）进行巢式 PCR 扩增，分别获得 3′端和 5′端的核苷酸序列，大小分别为 1 016 和 1 662 bp。根据柑橘全爪螨 *PcHsp*90 基因 cDNA 中间片段、3′端及 5′端的核苷酸序列，利用 DNAMAN 进行序列拼接，确定 *PcHsp*90 基因 cDNA 的开放阅读框（ORF）及 3′和 5′端的非编码区（3′-UTR 和 5′-UTR）。通过全长引物（表 1）扩增得到全长验证产物（图 1：B），测序结果表明，全长引物扩增所得片段与拼接所得序列完全一致，表明通过 RT-PCR 和 RACE 技术，成功克隆获得了柑橘全爪螨 *PcHsp*90 基因的 cDNA 全长序列。

2.2 柑橘全爪螨 *PcHsp*90 序列生物信息学分析

克隆获得的柑橘全爪螨 *PcHsp*90 的 cDNA 长度为 2 763 bp，开放阅读框长度为 2 193 bp，编码 730 个氨基酸残基，起始密码子和终止密码子分别为 ATG 和 TAA，5′端和 3′端非编码区长度分别为 282 和 288 bp。在 *PcHsp*90 基因 cDNA 全长序列的 3′端具有 poly-A 结构，在 poly-A 结构的前端具有典型的加尾信号 AATAAA（图 2），说明克隆得到的 cDNA 序列是完整的。将鉴定获得的柑橘全爪螨 *PcHsp*90 cDNA 全长序列提交到 NCBI 核苷酸数据库，GenBank 登录号为 GQ495086。

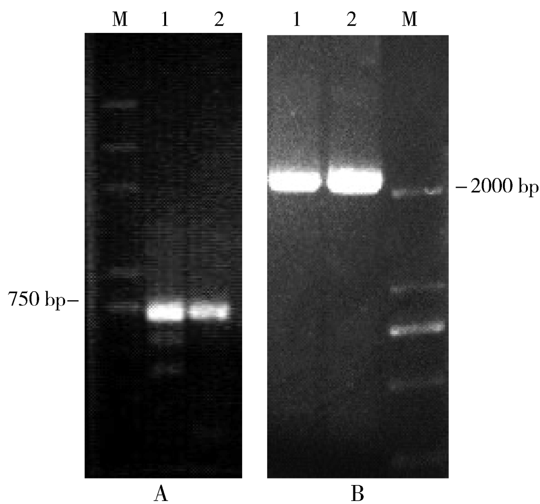


图1　柑橘全爪螨 *PcHsp*90 cDNA 中间片段和全长验证电泳图

Fig. 1　Agarose gel electrophoresis of the intermediate fragment and full-length cDNA of *PcHsp*90 gene from *Panonychus citri*

A：中间片段 Intermediate fragment；B：全长产物 Full-length product. 1－2：PCR 产物 PCR products；M：DNA 分子量标准 DNA molecular weight marker.

根据在线软件 ProtParam 分析，柑橘全爪螨热激蛋白基因 *PcHsp*90 全长 cDNA 序列推导的蛋白质理论分子量 83.85 kDa，等电点为 4.99，具有 Hsp90 家族蛋白质的 5 个典型签名序列，它们分别是：NKEIFLRELISNSSDALDKIR（位于第 36－56 位氨基酸处）、LGTIARSG（位于第 103－110 位氨基酸处）、IGQFGVGFYSAYLVAD（位于第 127－142 位氨基酸处）、IKLYVRRVFI（位于第 357－366 位氨基酸处）和 GVVDSEDLPLNISRE（位于第 383－397 位氨基酸处）。而且，"MEEVD"（位于第 726－730 位氨基酸处）是细胞质型 Hsp90 家族 C-端标志基序。以上这些 Hsp90 家族蛋白质分子特征充分说明，克隆获得了细胞质型 Hsp90 基因 cDNA 序列（图 2）。

为验证 Hsp90 的保守性及不同物种间 Hsp90 的亲缘关系，从 NCBI 站点的 GenBank 中下载了来自其他物种的 12 个 Hsp90 氨基酸序列，与 *PcHsp*90 推导的氨基酸序列共同构建系统发育树。从构建结果看，PcHsp90 与朱砂叶螨的 TcHsp90 最先聚为一支，然后才与肩突硬蜱 *Ixodes scapularis* Hsp90 相聚在一起，最后与昆虫的 Hsp90 相聚，这与传统认为的分类关系较为一致。用于构建 Hsp90 系统发育树的 13 个物种中，柑橘全爪螨与朱砂叶螨亲缘关系最近，同属于蜱螨亚纲（Acari）真螨总目（Acariformes）叶螨科（Tetranychidae），而与肩突硬蜱亲缘关系稍远，仅同属于蜱螨亚纲，与其他物种同属节肢动物门（Arthropoda），亲缘关系更远（图 3）。

2.3　柑橘全爪螨不同发育阶段及高低温胁迫下 *PcHsp*90 表达模式分析

在 25℃ 条件下，柑橘全爪螨卵期、幼螨期、若螨期、雄成螨及雌成螨的 *PcHsp*90 的 mRNA 相对表达量分别为：0.71，0，44，0.91，0.80 和 1.00。差异显著性分析表明，柑橘全爪螨若螨期及成螨期 *PcHsp*90 的 mRNA 相对表达量显著高于幼螨期（$F=5.337$；$df=4, 10$；$P=0.015$），幼螨期的 mRNA 表达量分别为上述时期的 0.49，0.55 及 0.44倍；*PcHsp*90 的 mRNA 表达量在卵、若螨及成螨阶段虽有变化，但差异不显著，卵与幼螨期的差异亦不显著（图 4：A）。柑橘全爪螨在 0～10℃ 低温胁迫下，*PcHsp*90 的 mRNA 表达量有所下降，0，5 和 10℃ 时，相对表达量分别为对照 25℃ 时的 0.71，0.79和 0.69 倍，但差异未达到显著水平（$F=0.878$；$df=3, 8$；$P=0.492$）（图 4：B）；而在 35～41℃ 的高温胁迫下，*PcHsp*90 的 mRNA 相对表达量随胁迫温度的升高而上调，相对表达量分别为对照的 1.59，3.21 及 6.75 倍，且在 41℃ 高温胁迫下，mRNA 表达量显著高于 25，35 及 38℃ 处理下的 mRNA 表达水平（$F=8.686$；$df=3, 8$；$P=0.007$），分别是 35 和 38℃ 时的 4.25 和 2.10 倍，但 25，35 和 38℃ 处理间 mRNA 相对表达差异并不显著（图 4：C）。

3　讨论

3.1　柑橘全爪螨 *PcHsp*90 序列生物信息学分析

本研究从柑橘全爪螨体内克隆鉴定出一条 Hsp90 家族基因的 cDNA 全长序列，编码的蛋白质分子量为 83.85 kDa，与其他生物的 Hsp90 分子量相近。不仅如此，PcHsp90 还具有 Hsp90 家族典型的 5 个特征基序，证明克隆得到的基因属于 Hsp90 家族。而且该基因编码的氨基酸序列还具有细胞质 Hsp90 C-端基序"MEEVD"，它能与分子伴侣辅助因子（co-chaperones）的 TPR（tetratricopeptide repeat）结构域结合（Johnson and Brown，2009），组成分子伴侣复合体，进一步与顾客蛋白（client protein）结合，发挥 Hsp90 的分子伴侣功能，如帮助新生肽链折叠、变性蛋白复性、受损蛋白降解等（Astakhova *et al.*，2013）。由于 Hsp90 高度保守，因此可作为分子标记用于物种系统进化分析（申建茹等，2011；Li and Du，2013），本研究中，柑橘全爪螨 PcHsp90 系统发育分析结果表明，其与同为蜱螨亚纲的朱砂叶螨和肩突硬蜱的 Hsp90 亲缘关系较近，而与昆虫的

```
1     ACATGGGGATTCACTTACATGCTTTCTTTCAGTCTATTGTCTCAAACTTGCGATTAAATTAATTCTAATTCTCTGTTAATTGACTAATTT
91    TCTTTGTGATCTTTTCTCGTCCTTAAACTGACAATTTGTTGTTGACCATTTACTATTGATTAGTATTATTGATCAGTTTATTTTCCTTTG
181   TCTGTAAGAGTGTTTTTCTTTTTTTGTGTTTTTGCTTTATTTTCTTGTGAATTTAAAAAAGCCGATTTTTTTTTGTGTTCAATTTGTTGA
271   AAAGAATTTAAAATGCCTGAAGAACCAATGACCGCTACTAATGAAGATGCTGAAACCTTTTTGTTTCAAGCTGAAATCGCTCAGTTGATG
1                   M  P  E  E  P  M  T  A  T  N  E  D  A  E  T  F  L  F  Q  A  E  I  A  Q  L  M

361   ACTTTGATCATCAACACTTTTTATTCTAACAAAGAAATTTTCCTTCGGGAATTGATCTCCAATTCTTCTGATGCTCTTGACAAAATCCGT
27     T  L  I  I  N  T  F  Y  S  N  K  E  I  F  L  R  E  L  I  S  N  S  S  D  A  L  D  K  I  R

451   TATGAGTCACTTATCGATGCTTCTAAGCTTGATTCTGGTAAAGATCTTTACATTAAAATTGTTCCAAACAAAGAGGAACGAACCTTAACC
57     Y  E  S  L  I  D  A  S  K  L  D  S  G  K  D  L  Y  I  K  I  V  P  N  K  E  E  R  T  L  T

541   ATTATTGATACTGGTATTGGTATGACCAAAGCTGATTTAATCAATAATTTGGGTACCATTGCCAGATCTGGTACTAAAGCTTTTATGGAG
87     I  I  D  T  G  I  G  M  T  K  A  D  L  I  N  N  L  G  T  I  A  R  S  G  T  K  A  F  M  E

631   GCTCTTCAAGCCGGTGCCGATATCTCCATGATTGGTCAATTTGGTGTCGGTTTCTACTCAGCTTATTTGGTCGCTGATCGGGTTGTTGTT
117    A  L  Q  A  G  A  D  I  S  M  I  G  Q  F  G  V  G  F  Y  S  A  Y  L  V  A  D  R  V  V  V

721   ACATCCAAGCACAATGATGATGACTGTTATACTTGGGAATCATCTGCTGGTGGTTCATTCACCATTAAAAAGACAACCGATCCTGATTGT
147    T  S  K  H  N  D  D  D  C  Y  T  W  E  S  S  A  G  G  S  F  T  I  K  K  T  T  D  P  D  C

811   GTTCGAGGTACTAAAATTGTTTTATGGTTAAAGGATGACCAAAATGACTATCTCGATGAGAAGAAAATTAAAGAGGTGGTAAAGAAACAC
177    V  R  G  T  K  I  V  L  W  L  K  D  D  Q  N  D  Y  L  D  E  K  K  I  K  E  V  V  K  K  H

901   AGTCAATTTATTGGTTACCCGATTAAGCTTGTTGTCCAAAAGGAGAGAGAAAAGGAAGTGTCCGATGATGAAGGTGAAGAGGAGAAAAAG
207    S  Q  F  I  G  Y  P  I  K  L  V  V  Q  K  E  R  E  K  E  V  S  D  D  E  G  E  E  E  K  K

991   GAAGAAGACGAGGAAAAGAAGAAGGAAAATGATGAAGAAAAGAAAGACGATGACGAAGAACCAAAGGTAGAGGATGTTGAAGATGAGGAT
237    E  E  D  E  E  K  K  K  E  N  D  E  E  K  K  D  D  D  E  E  P  K  V  E  D  V  E  D  E  D

1081  AAAAAGGACAAGAAAAAGAAAAAAAAGGTAACCGAAAAGTACATTGAAGACGAAGAGCTTAACCGAACCAAGCCCCTTTGGATGAGAAAT
267    K  K  D  K  K  K  K  K  K  V  T  E  K  Y  I  E  D  E  E  L  N  R  T  K  P  L  W  M  R  N

1171  CCTGATGACATTACCCAATCTGAATATGGTGAATTTTATAAAAGTCTAACCAATGATTGGGAGGAACATTTGGCAGTTAAACATTTCTCT
297    P  D  D  I  T  Q  S  E  Y  G  E  F  Y  K  S  L  T  N  D  W  E  E  H  L  A  V  K  H  F  S

1261  GTTGAAGGTCAACTCGAATTCCGAGCTTTACTATTTGTACCAAAACGAGCTCCATTCGATCTTTTTGAAAATAGGAAACAAAAGAACAAT
327    V  E  G  Q  L  E  F  R  A  L  L  F  V  P  K  R  A  P  F  D  L  F  E  N  R  K  Q  K  N  N

1351  ATCAAATTGTATGTCCGTCGGGTTTTCATCATGGACAATTGTGAGGATCTCATTCCAGAATATCTCAACTTTATCAAGGGTGTGGTTGAT
357    I  K  L  Y  V  R  R  V  F  I  M  D  N  C  E  D  L  I  P  E  Y  L  N  F  I  K  G  V  V  D

1441  TCTGAAGATTTACCATTGAACATTTCCCGAGAAATGTTACAACAAAATAAGATCTTGAAAGTTATCCGTAAGAGTTTGGTGAAACGGTGT
387    S  E  D  L  P  L  N  I  S  R  E  M  L  Q  Q  N  K  I  L  K  V  I  R  K  S  L  V  K  R  C

1531  ATCGAATTGTCCGAAGAGGTAGCCGAAGGTAAAGAGGCTTACAAAAAGTTTTATGAACAATTTAGTAAAAACATGAAACTTGGTATCCAC
417    I  E  L  S  E  E  V  A  E  G  K  E  A  Y  K  K  F  Y  E  Q  F  S  K  N  M  K  L  G  I  H

1621  GAAGACACTGGAAACCGAAAGAAGATCGCCGATCTTTTAAGATTTTATACTTCAGCTTCTGGTGATGAGATGTGTTCTCTTAAAGATTAT
447    E  D  T  G  N  R  K  K  I  A  D  L  L  R  F  Y  T  S  A  S  G  D  E  M  C  S  L  K  D  Y

1711  GTTTCCCGAATGAAGGACAATCAAAAATCAATTTACTCCATTACCGGTGAATCAAAGGAACAAGTAGCCGCCTCTGCTTTCGTTGAGCGA
477    V  S  R  M  K  D  N  Q  K  S  I  Y  S  I  T  G  E  S  K  E  Q  V  A  A  S  A  F  V  E  R

1801  GTTCGAAGCCGAGGATTCGAAGTGGTTTACATGGTGGAACCAATTGATGAGTATTGTGTCCAACAATTGAAAGAGTATGAGGGTAAACCT
507    V  R  S  R  G  F  E  V  V  Y  M  V  E  P  I  D  E  Y  C  V  Q  Q  L  K  E  Y  E  G  K  P

1891  TTAGTTTCCGTTACCAAAGAAGGTCTTGAACTTCCCGAGACCGACGAGGAGAAGAAGAAGAGGGAAGAAGATGTAAAGAAATTCGAGACT
537    L  V  S  V  T  K  E  G  L  E  L  P  E  T  D  E  E  K  K  K  R  E  E  D  V  K  K  F  E  T

1981  CTATGCAAGGTGATGAAAGATGTGCTCGAAAAGCGAGTCGAAAAGGTAACAATCTCTAATCGTTTAGTTACCTCTCCATGTTGTATTGTC
567    L  C  K  V  M  K  D  V  L  E  K  R  V  E  K  V  T  I  S  N  R  L  V  T  S  P  C  C  I  V

2071  ACAAGTCAATATGGTTGGTCTGCCAACATGGAAAGAATAATGAAAGCTCAAGCTCTTCGGGACACAACGACCATGGGCTACATGGCAGCG
597    T  S  Q  Y  G  W  S  A  N  M  E  R  I  M  K  A  Q  A  L  R  D  T  T  T  M  G  Y  M  A  A

2161  AAGAAACATCTTGAAATCAATCCCGATCATCCAATTGTAGAGAATTTGAGACAAAGGATCGAGGCTGATAAGAGTGATAAAGCCGTTAAA
627    K  K  H  L  E  I  N  P  D  H  P  I  V  E  N  L  R  Q  R  I  E  A  D  K  S  D  K  A  V  K

2251  GATTTAGTCATGTTACTTTTTGAAACTGCTCTTCTCTGTTCTGGATTCTCTTTGGAAGATCCACAAAATCATTCGTCTAGAATTTATCGT
657    D  L  V  M  L  L  F  E  T  A  L  L  C  S  G  F  S  L  E  D  P  Q  N  H  S  S  R  I  Y  R

2341  ATGATTAAACTTGGTCTTGGAATTGATGAAGATCTTGTGGAAGTTGGTGGTGGTGGTGATAAAGTTGCCGAAGCGGAAATGCCAGCATTA
687    M  I  K  L  G  L  G  I  D  E  D  L  V  E  V  G  G  G  G  D  K  V  A  E  A  E  M  P  A  L

2431  GAAGGTGATGCCGAAGATGCATCAAGAATGGAGGAAGTTGATTAAATCAAATTTTAAAATTTCTATAATTAATCATACTCATTGAAAGAA
717    E  G  D  A  E  D  A  S  R  M  E  E  V  D  *

2521  CACAGAAGATGATCGATCAACAGTATCCTCTTTCTATCATTACTCTTTTCTCTTTTCTCAACCCTTTCCCTAAAATCAATCAATTAGTCT
2611  CTTTAATCACCAAAAATTGACTAATTATTTTACTCTTGATTGCTTTTTGTTTCCTCTTTTCCTTTTCCTTTTCTATTTATTGAAAATCTC
2701  ACTTCAATATCTTTTCTCAATTTCATTTTTTCCAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

图 2 柑橘全爪螨热激蛋白基因 *PcHsp*90 核苷酸序列和推导的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequence of heat shock protein 90 gene (*PcHsp*90) from *Panonychus citri*

Hsp90 家族的 5 个保守基序用单下划线标出，细胞质型 Hsp90 C-端基序（MEEVD）用双下划线标注，可能的加尾信号用灰色盒子标注，星号表示终止密码子的位置；下划线数字表示氨基酸残基位置，非下划线数字表示核苷酸位置。The highly conserved five motifs of Hsp90 family are underlined. The cytoplasm Hsp90 C-terminal region (MEEVD) is emphasized with double underline. A possible consensus signal sequence for polyadenylation is indicated with grey box. The asterisk indicates the translational termination codon. Underlined numbers indicate amino acid residue position, and non-underlined numbers indicate nucleotide residue position.

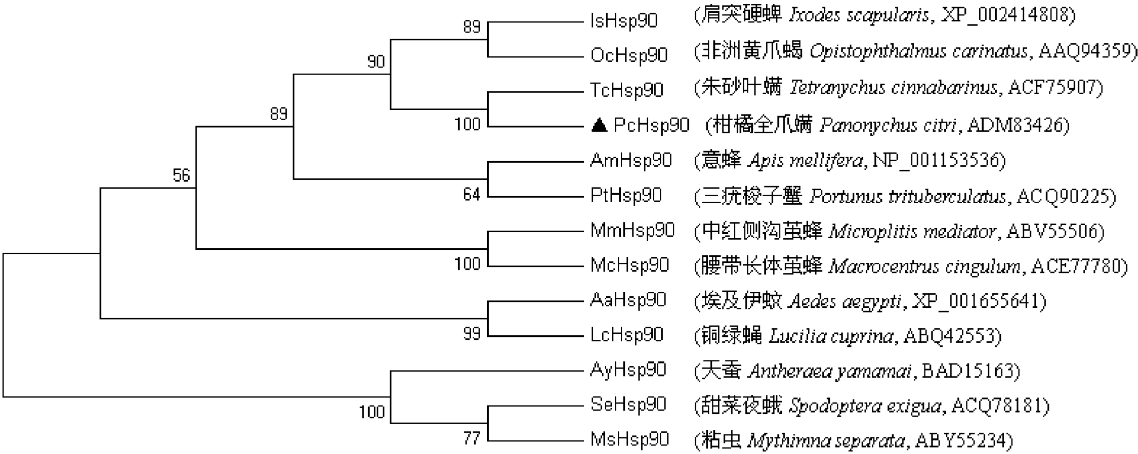


图 3　邻接法构建的柑橘全爪螨 *PcHsp*90 推导的氨基酸序列和其他物种 Hsp90 的系统发育树

Fig. 3　A phylogenetic tree of the deduced amino acid sequence of *PcHsp*90 from *Panonychus citri* with Hsp90 sequences from other species reconstructed using the Neighbor-Joining method

Hsp90 亲缘关系较远,这与传统的形态分类学结果一致,也与其他生物 Hsp90 系统发育分析结果吻合(张青等, 2014; Mihailović *et al.*, 2016),进一步证实 Hsp90 的保守性,以及作为分子标记基因的可靠性。

3.2　柑橘全爪螨 *PcHsp*90 功能分析

3.2.1　*PcHsp*90 与该螨发育的相关性分析：Hsps 不仅与生物响应环境胁迫相关,还参与正常的生理活动,主要是通过分子伴侣功能,如折叠新生肽链并形成成熟蛋白质,参与细胞分化及配子的形成等(Sørensen *et al.*, 2003; Mihailović *et al.*, 2016)。*PcHsp*90 在柑橘全爪螨各发育阶段均有表达,且在雌成螨体内的 mRNA 相对表达水平最高,卵期、若螨期及雄成螨次之,幼螨期表达量较低,显著低于若螨期和成螨期的 *Hsp*90 表达量,推测该基因与柑橘全爪螨的生长发育有关。另据作者观察,幼螨的死亡率较高,抗逆能力差,可能与其较低的 *Hsp*90 表达量有关。*Hsp*90 在大多生物体的各发育阶段均大量表达,与生长发育密切相关:降低果蝇体内 *Hsp*90 表达,或抑制其编码蛋白与底物结合,将出现发育缺陷或形态改变(Wang *et al.*, 2004)。不同物种体内的 *Hsp*90 表达量在各发育阶段的变化不尽相同:斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 的 *Hsp*90 mRNA 的最高表达量在成虫阶段(Shen *et al.*, 2014),灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 体内的最高表达量在 4 龄若虫,成虫 *Hsp*90 mRNA 的表达量则较低(张青等, 2014),斑潜蝇 *Liriomyza sativa Hsp*90 在幼虫、蛹、成虫期 mRNA 表达量依次升高(Huang *et al.*, 2009),这说明 *Hsp*90 的表达具有物种特异性。为更好理解 Hsp90 在生物生长发育中的作用,需要扩大研究范围,为 *Hsp*90 的功能研究提供基础资料。柑橘全爪螨 *PcHsp*90 mRNA 在不同发育阶段的表达差异,为进一步研究 *Hsp*90 的生理功能奠定基础。

3.2.2　*PcHsp*90 在低温胁迫下的表达模式分析：为适应低温胁迫,生物在进化过程中形成了各种响应机制,如合成海藻糖和多元醇等小分子物质,生成抗冻蛋白及 Hsps(Michaud and Denlinger, 2004)。但有时 *Hsps* 并不能被低温胁迫所诱导:马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 的 *Ld-hsp*90 尽管能被 38 和 44℃的高温诱导表达,却不能被 0 ~ 10℃低温诱导表达(蒋健等,2013);0 ~ 5℃的低温亦不能诱导甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua Hsp*90 mRNA 相对表达量的上调(Jiang *et al.*, 2012);灰飞虱的 2 个基因(*Lhsp*90-1 和 *Lhsp*90-2)尽管均能被高温明显诱导,但前者对低温诱导不敏感,而后者则易被低温所诱导(王利华等, 2015),说明即使同一物种的不同 *Hsp*90 基因响应的胁迫因素有所不同。本研究发现柑橘全爪螨在 0 ~ 10℃冷激条件下,*PcHsp*90 未能被诱导表达,提示柑橘全爪螨可能以其他机制响应低温胁迫,如小分子物质海藻糖的合成、抗氧化反应、其他 *Hsps* 的诱导表达或正常条件下该螨体内的 *Hsps* 含量足以抵御低温胁迫。关于低温胁迫下的抗氧化反应,已有研究表明柑橘全爪螨的抗氧化酶如 SOD 和 GST 活性在低温胁迫下有升高趋势(Yang *et al.*, 2010),柑橘全爪螨对于低温胁迫的其他响应机制还有待进一步研究。

3.2.3　*PcHsp*90 在高温胁迫下的表达模式分析：Hsps 是生物体响应各种环境胁迫(包括高温和低温

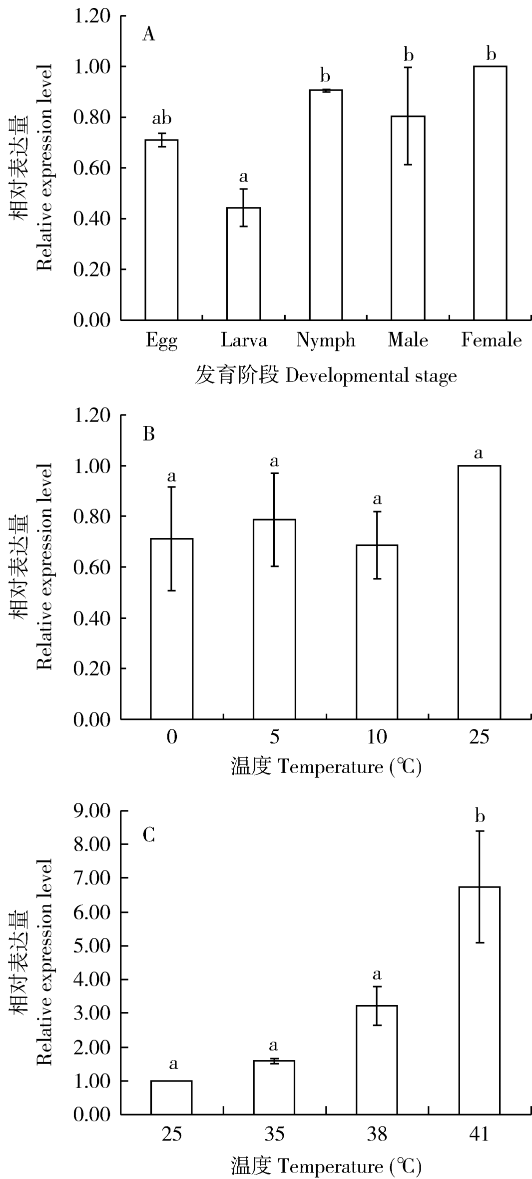


图 4　柑橘全爪螨 *PcHsp*90 mRNA 在不同发育阶段(A)、低温胁迫(B)和高温胁迫(C)下的相对表达模式

Fig. 4　Relative expression patterns of *PcHsp*90 mRNA in *Panychus citri* at different developmental stages (A) and under cold stress (B) and heat stress (C)

Egg: 卵 Egg; Larva: 幼螨 Larva ; Nymph: 若螨 Nymph; Male: 雄成螨 Male adult; Female: 雌成螨 Female adult. 图中数据为平均数 ± *SE*;柱上不同字母表示显著性差异($P < 0.05$, DMRT, 方差分析); 不同发育阶段及低温和高温胁迫分别以雌成螨和 25℃ 为对照。Data in th figure are mean ± *SE*; different letters above bars indicate significant difference ($P < 0.05$, DMRT in ANOVA); female adult and 25℃ were served as the control at different developmental stages and under cold or heat stress, respectively.

胁迫)的重要机制之一(Sørensen *et al*., 2003)。温和的高温锻炼可诱导生物合成 Hsps,提高机体的耐热能力,使其在随后遭遇极端高温时,存活率显著提高(Kang *et al*., 2009; Shen *et al*., 2014)。高温诱导生物合成 *Hsp*90 的报道较多,例如:灰飞虱和褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 体内 *Hsp*90 的表达量均随着温度的升高而上升(张青等, 2014; 姜建军等, 2015);苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* 在 35℃及以上高温胁迫时,*Hsp*90 表达量发生显著变化(申建茹等, 2011);40℃高温诱导朱砂叶螨,*Hsp*90 表达量亦显著升高(Feng *et al*., 2010)。这些结果提示 *Hsp*90 与生物抵御高温胁迫有明显的相关性。本研究中,柑橘全爪螨 *PcHsp*90 mRNA 的相对表达量随胁迫温度的升高逐渐上调,提示高温可引起柑橘全爪螨的胁迫响应,尤其是高温 41℃时,*PcHsp*90 表达量显著升高,增加 Hsp90 的合成,发挥其分子伴侣功能,保护机体细胞免受蛋白质变性引起的损伤。如本文引言中所述,35℃以上高温已不利于柑橘全爪螨生长发育,为何高温 35℃及 38℃均不能诱导 *PcHsp*90 mRNA 相对表达量显著升高,直到温度高达 41℃时,*PcHsp*90 mRNA 相对表达量才显著升高呢? 这是因为,*Hsps* 是否能被诱导还与生物的生境情况有关:南极蚊 *Belgica antarctica* 幼虫的生境温度较低,其体内的 *Hsps* 呈组成型表达,且不能被诱导表达(Rinehart *et al*., 2006);一些高度适应沙漠环境的生物,其体内的 *Hsps* 表达水平在正常情况下就比较高,不利因素并不能进一步诱导其表达 *Hsps*(Evgen'ev *et al*., 2007),结合本研究结果,分析认为,由于生存环境不利,在长期进化过程中,生物体内 *Hsps* 呈现组成型表达,足以抵御胁迫造成的伤害,不必进一步诱导 *Hsps* 表达。因为 *Hsps* 的诱导表达虽然有助于提高生物体的热忍耐力,但常会付出代价,如缩短寿命、生殖力下降等(Shen *et al*., 2014),因此,生物会在"收益"和"代价"之间寻找平衡(Sørensen *et al*., 2003; Wang *et al*., 2004)。柑橘主产区分布在我国南方,夏季气温普遍较高,柑橘全爪螨在长期的适应过程中,对高温胁迫较高的耐受性,直到胁迫温度达 41℃时,*PcHsp*90 mRNA 表达量才显著升高。因此,诱导生物表达 *Hsps* 的温度可提示生物对高温的敏感程度,有研究表明,诱导机体 *Hsps* 表达发生显著变化的温度越高,预示该生物可能越耐高温(Yu and Wan, 2009)。

本研究成功克隆柑橘全爪螨 *PcHsp*90 基因全长 cDNA,据软件预测该基因编码的 PcHsp90 蛋白质属于细胞质型 Hsps;*PcHsp*90 mRNA 表达在柑橘全爪螨不同发育阶段均有表达,且能被高温胁迫诱导表达,提示 Hsp90 是柑橘全爪螨生长发育的重要参与者,并在抵御高温胁迫中发挥着重要作用。本研究结果为理解该害螨的抗逆能力及种群季节动态规律提供了分子基础。

参考文献（References）

Astakhova LN, Zatsepina OG, Przhiboro AA, Evgen'ev MB, Garbuz DG, 2013. Novel arrangement and comparative analysis of *hsp*90 family genes in three thermotolerant species of Stratiomyidae (Diptera). *Insect Mol. Biol.*, 22(3): 284 – 296.

Ding TB, Niu JZ, Xia WK, Sun QQ, Dou W, Wang JJ, 2012. Susceptibility to acaricides and detoxification enzyme activity of four field populations of *Panonychus citri*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(2): 382 – 389. [丁天波，牛金志，夏文凯，孙倩倩，豆威，王进军，2012. 柑橘全爪螨田间种群敏感性测定及三种主要解毒酶活性比较. 应用昆虫学报，49(2): 382 – 389]

Evgen'ev MB, Garbuz DG, Shilova VY, Zatsepina OG, 2007. Molecular mechanisms underlying thermal adaptation of xeric animals. *J. Biosci.*, 32(3): 489 – 499.

Feder ME, Hofmann GE, 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.*, 61(1): 243 – 282.

Feng H, Wang L, Liu Y, He L, Li M, Lu W, Xue C, 2010. Molecular characterization and expression of a heat shock protein gene (*HSP*90) from the carmine spider mite, *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval). *J. Insect Sci.*, 10(1): 112.

Huang LH, Wang CZ, Kang L, 2009. Cloning and expression of five heat shock protein genes in relation to cold hardening and development in the leafminer, *Liriomyza sativa*. *J. Insect Physiol.*, 55(3): 279 – 285.

Jiang J, Li XR, Zhang YH, Guo WC, Cheng DF, Guo QY, 2013. cDNA cloning of heat shock protein 90 (*Ld-hsp*90) in *Leptinotarsa decemlineata* (Coleptera: Chrysomelidae) and its expression under temperature stress. *Acta Phytophylacica Sinica*, 40(5): 399 – 406. [蒋健，李祥瑞，张云慧，郭文超，程登发，郭青云，2013. 马铃薯甲虫热激蛋白基因 *Ld-hsp*90 的克隆及温度胁迫下的表达. 植物保护学报，40(5): 399 – 406]

Jiang JJ, Huang LF, Chen HS, Yang L, 2015. Identification of reference genes and expression analysis of heat shock protein genes in the brown plant hopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae), after exposure to heat stress. *Acta Entomologica Sinica*, 58(5): 479 – 486. [姜建军，黄立飞，陈红松，杨朗，2015. 褐飞虱热胁迫下内参基因的筛选及热激蛋白基因表达分析. 昆虫学报，58(5): 479 – 486]

Jiang X, Zhai H, Wang L, Luo L, Sappington TW, Zhang L, 2012. Cloning of the heat shock protein 90 and 70 genes from the beet armyworm, *Spodoptera exigua*, and expression characteristics in relation to thermal stress and development. *Cell Stress Chaperon.*, 17(1): 67 – 80.

Johnson JL, 2012. Evolution and function of diverse Hsp90 homologs and cochaperone proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1823(2): 607 – 613.

Johnson JL, Brown C, 2009. Plasticity of the Hsp90 chaperone machine in divergent eukaryotic organisms. *Cell Stress Chaperon.*, 14(1): 83 – 94.

Kang L, Chen B, Wei JN, Liu TX, 2009. Roles of thermal adaptation and chemical ecology in *Liriomyza* distribution and control. *Annu. Rev. Entomol.*, 54(1): 127 – 145.

Kasap I, 2009. The biology and fecundity of the citrus red mite *Panonychus citri* (McGregor) (Acari: Tetranychidae) at different temperatures under laboratory conditions. *Turk. J. Agric. For.*, 33(6): 593 – 600.

Li HB, Du YZ, 2013. Molecular cloning and characterization of an Hsp90/70 organizing protein gene from *Frankliniella occidentalis* (Insecta: Thysanoptera, Thripidae). *Gene*, 520(2): 148 – 155.

Li R, Liu J, Li SL, Li N, Li SC, Hong JP, 2015. Effects of temperature induction on the expression level of *hsp*70 and *hsp*90 gene in *Pardosa astrigera* L. Koch. *Acta Phytophylacica Sinica*, 42(3): 321 – 326. [李锐，刘佳，李萨丽，李娜，李生才，洪坚平，2015. 温度诱导对星豹蛛热激蛋白 *hsp*70 和 *hsp*90 基因表达的影响. 植物保护学报，42(3): 321 – 326]

Makhnevych T, Houry WA, 2011. The role of Hsp90 in protein complex assembly. *Biochim. Biophys. Acta*, 1823(3): 674 – 682.

Michaud MR, Denlinger DL, 2004. Molecular modalities of insect cold survival: current understanding and future trends. *Int. Congr. Ser.*, 1275(1): 32 – 46.

Mihailović M, Blagojević D, Ogrinc N, Simonović P, Simić V, Vidaković M, Dinić S, Uskoković A, Grdović N, Arambašić-Jovanović J, Đorđevića M, Tolića A, Kračun-Kolarevića M, Kolarevića S, Piriae M, Paunovića M, 2016. Biochemical indicators and biomarkers in chub (*Squalius cephalus* L.) from the Sava River. *Sci. Total Environ.*, 540: 368 – 376.

Niu JZ, Dou W, Ding TB, Yang LH, Shen GM, Wang JJ, 2012. Evaluation of suitable reference genes for quantitative RT-PCR during development and abiotic stress in *Panonychus citri* (McGregor) (Acari: Tetranychidae). *Mol. Biol. Rep.*, 39(5): 5841 – 5849.

Rinehart JP, Hayward SAL, Elnitsky MA, Sandro LH, Lee RE, Denlinger DL, 2006. Continuous up-regulation of heat shock proteins in larvae, but not adults, of a polar insect. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(38): 14223 – 14227.

Shen JR, Li MF, Chen NZ, Wang JJ, Wan FH, 2011. Cloning and analysis of the expression characteristics under heat stress of Hsp90 gene in the codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Acta Entomologica Sinica*, 54(11): 1236 – 1248. [申建茹，李明福，陈乃中，王进军，万方浩，2011. 苹果蠹蛾热激蛋白 Hsp90 基因的克隆及热胁迫下的表达分析. 昆虫学报，54(11): 1236 – 1248]

Shen Y, Gong YJ, Gu J, Huang LH, Feng QL, 2014. Physiological effect of mild thermal stress and its induction of gene expression in the common cutworm, *Spodoptera litura*. *J. Insect Physiol.*, 61: 34 – 41.

Sørensen JG, Kristensen TN, Loeschcke V, 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecol. Lett.*, 6(11): 1025 – 1037.

Tkáčová J, Angelovičová M, 2012. Heat shock proteins (HSPs): a review. *Anim. Sci. Biotechnol.*, 45 (1): 349 – 353.

Wang HD, Kazemi-Esfarjani P, Benzer S, 2004. Multiple-stress analysis for isolation of *Drosophila* longevity genes. *Proc. Natl. Acad.

Sci. USA, 101(34): 12610 – 12615.

Wang LH, Shan D, Yao J, Fang JC, 2015. Induced expression of the heat shock protein 70 and 90 genes by exposure to high temperature and chlorpyrifos in female of *Laodelphax striatellus*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 52(4): 828 – 836. [王利华, 单丹, 姚静, 方继朝, 2015. 温度和毒死蜱对灰飞虱雌成虫热激蛋白 70 和 90 基因的诱导表达特性研究. 应用昆虫学报, 52(4): 828 – 836]

Wei J, Lü ZC, Wang R, Wan FH, 2014. Comparative and analysis of the copy nimbers of *hsp*70 and *hsp*90 in *Trialeurodes vaporariorum* and three cryptic species of *Bemisia tabaci* complex (Hemiptera: Aleyrodidae). *Acta Entomologica Sinica*, 57(6): 647 – 655. [韦姣, 吕志创, 王韧, 万方浩, 2014. 温室粉虱和烟粉虱 3 个隐种中热激蛋白基因 *hsp*70 和 *hsp*90 含量的比较分析. 昆虫学报, 57(6): 647 – 655]

Xu NC, Lang GL, Liu LF, 2003, Occurrence rule and control measures of *Panonychus citri*. *Plant Protection Technology and Extension*, 23(9): 22 – 23. [徐南昌, 郎国良, 刘立峰, 2003. 柑橘全爪螨发生规律及防治措施. 植保技术与推广, 23(9): 22 – 23]

Xu PJ, Xiao JH, Xia QY, Murphy B, Huang DW, 2010. *Apis mellifera* has two isoforms of cytoplasmic HSP90. *Insect Mol. Biol.*, 19(4): 593 – 597.

Yang LH, Huang H, Wang JJ, 2010. Antioxidant responses of citrus red mite, *Panonychus citri* (McGregor) (Acari: Tetranychidae), exposed to thermal stress. *J. Insect Physiol.*, 56(12): 1871 – 1876.

Yang LH, Huang H, Wang JJ, 2014. Effect of exposure to heat stress on survival and fecundity of *Panonychus citri*. *Scientia Agricultura Sinica*, 47(4): 693 – 701. [杨丽红, 黄海, 王进军, 2014. 高温胁迫对柑橘全爪螨存活及生殖的影响. 中国农业科学, 47(4): 693 – 701]

Yang LH, Jiang HB, Liu YH, Dou W, Wang JJ, 2012. Molecular characterization of three heat shock protein 70 genes and their expression profiles under thermal stress in the citrus red mite. *Mol. Biol. Rep.*, 39(4): 3585 – 3596.

Yu H, Wan FH, 2009. Cloning and expression of heat shock protein genes in two whitefly species in response to thermal stress. *J. Appl. Entomol.*, 133(8): 602 – 614.

Zhang Q, Lu MX, Zhu SD, 2014. Cloning sequence analysis and expression profiling of heat shock protein 90 in the small brown plant hopper, *Laodelphax striatellus*. *Acta Entomologica Sinica*, 57(7): 777 – 786. [张青, 陆明星, 祝树德, 2014. 灰飞虱热激蛋白 Hsp90 基因的克隆、序列分析与表达模式. 昆虫学报, 57(7): 777 – 786]

(责任编辑: 袁德成)